

## Use of fungal phosphatidylinositol 3-kinases, especially *Candida albicans* CaVps34p, to screen for antifungal agents

Patent Number: DE19942268  
Publication date: 2000-03-30  
Inventor(s): ECK RAIMUND (DE); HAERTL ALBERT (DE); BRUCKMANN ASTRID (DE); KUENKEL WALDEMAR (DE); WETZKER REINHARD (DE)  
Applicant(s): KNOELL HANS FORSCHUNG EV (DE)  
Requested Patent: ☐ DE19942268  
Application Number: DE19991042268 19990904  
Priority Number(s): DE19991042268 19990904; DE19981041041 19980909  
IPC Classification: A61K35/70  
EC Classification: C12Q1/18, C12Q1/48, G01N33/573  
Equivalents:

### Abstract

The use of fungal phosphatidylinositol (PI) 3-kinases to screen for antifungals, is new. Independent claims are also included for the following: (1) the use of a cellular system to determine the effect of substances on a PI 3-kinase overexpressing fungal strain, in comparison with a reference strain; (2) the use of a cellular system to determine the effect of substances on the interaction of PI 3-kinases with other proteins; (3) the use of a cellular system to determine the effect of substances on the transcription of fungal PI 3-kinase genes; and (4) a test kit for screening for antifungal substances, comprising a fungal PI 3-kinase.

Data supplied from the esp@cenet database - I2



①⑨ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 199 42 268 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**A 61 K 35/70**

②① Aktenzeichen: 199 42 268.0  
②② Anmeldetag: 4. 9. 1999  
②③ Offenlegungstag: 30. 3. 2000

**DE 199 42 268 A 1**

⑥⑥ Innere Priorität:  
198 41 041. 7      09. 09. 1998  
  
⑦① Anmelder:  
Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V.,  
07745 Jena, DE

⑦② Erfinder:  
Bruckmann, Astrid, Dipl.-Biol., 07745 Jena, DE;  
Härtl, Albert, Dr., 07749 Jena, DE; Wetzker,  
Reinhard, Prof. Dr., 07751 Bucha, DE; Künkel,  
Waldemar, Dr., 07749 Jena, DE; Eck, Raimund, Dr.,  
07751 Bucha, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Rechercheantrag gem. Paragraph 43 Abs. 1 Satz PatG ist gestellt

⑤④ Screeningverfahren und Kits zum Auffinden antifugaler Substanzen

⑤⑦ Die Erfindung baut auf die überraschende Erkenntnis auf, das in *Candida albicans*, einem der bedeutendsten humanpathogenen Pilze, eine in die Signaltransduktion intrazellulärer Proteintransportprozesse involvierte Phosphatidylinositol 3-Kinase von essentieller Bedeutung für die Virulenz des Keimes im Maus-Candidosis-Modell ist. Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen zum Auffinden von neuen antifungal wirksamen Substanzen mit Hilfe von zellfreien und zellulären Testsystemen, wobei der Einfluß von Substanzen oder Substanzgemischen auf die biologische Aktivität solcher PI 3-Kinasen untersucht wird. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Bereitstellung von Testkits für den Einsatz von Target-orientierten, zellfreien und zellulären Screeningsystemen zur Suche nach Substanzen mit antifungal Wirkung.

**DE 199 42 268 A 1**

## Beschreibung

## Hintergrund der Erfindung

Das Ansteigen der Zahlen von Patienten mit einem geschwächten bzw. geschädigten Immunsystem führt gleichzeitig zu einem epidemischen Ansteigen von Erkrankungen, deren Ursache opportunistische pathogene Pilze sind. Die imperfekte Hefe *Candida albicans* ist dabei der Haupterreger invasiver Pilzkrankungen. Das von ihr verursachte Krankheitsbild wird als Candidosis bezeichnet. Ursprünglich als harmloser Kommensale der menschlichen Schleimhäute vorkommend, ist *C. albicans* bei AIDS-Kranken, nach Immunsuppression bei Organtransplantationen oder chemotherapeutisch behandelten Patienten wie auch bei anderen immungeschwächten Menschen oder Diabetikern in der Lage, systemische Mykosen hervorzurufen. Solche Systemmykosen, bei denen sich der Keim im gesamten Körper ausbreitet und die inneren Organe befällt, sind schwierig zu behandeln und weisen eine hohe Mortalitätsrate auf. Das Angebot der derzeit auf dem Arzneimittelmarkt befindlichen antifungalen Medikamente ist völlig unzureichend, da diese mit unerwünschten Nebenwirkungen belastet sind und im Wirtsorganismus eine zu hohe Toxizität und mangelnde Spezifität aufweisen. Außerdem werden bei den gegenwärtig verwendeten antifungalen Pharmaka Resistenzentwicklungen beobachtet. Ein wichtiges Forschungsziel besteht deshalb darin, neue antifungal wirksame Substanzen zu finden. Die Schlüsselvoraussetzung für eine schnelle und effektive Suche nach solchen Antimykotika ist die Identifizierung und Charakterisierung neuer molekularer Targets in *C. albicans*. Daneben spielen natürlich auch andere humanpathogene Pilze eine Rolle, auf die sich eine solche Vorgehensweise gleichermaßen anwenden läßt. Ausgehend von potentiellen Targets für antifungale Substanzen können effektive Testsysteme für das Primärscreening entwickelt werden, die gleichzeitig einen hohen Probendurchsatz ermöglichen. Einige potentielle Targets für die Suche nach neuen Leitstrukturen antifungal wirksamer Substanzen sind bereits identifiziert (Groll et al. (1998), Trends in Microbiology 6, 3: 117-124). Für eine erfolgreiche Suche nach neuen Antimykotika steht die Identifizierung weiterer potentieller Targets und die davon abgeleitete Entwicklung Target-orientierter Testsysteme im Mittelpunkt des Interesses.

Ein wichtiges Merkmal eines pathogenen Keimes ist seine Virulenz. Darunter versteht man die Gesamtheit der Faktoren, die die krankmachende Wirkung des Keimes im Verlauf der Infektion bewirken. Bei *C. albicans* sind z. B. die Adhärenz an epitheliale und endotheliale Zellen des Wirtes und die Sekretion von sauren Aspartylproteasen Virulenzfaktoren. Auch die Bildung von Hyphen wird als wichtige Voraussetzung für die Virulenz von *C. albicans* angesehen. Bisher gibt es jedoch keine Hinweise, daß Proteine, die bei der Signaltransduktion intrazellulärer Transportprozesse eine Rolle spielen, im Zusammenhang mit der Virulenz stehen. Die Einschränkung bzw. Aufhebung der Virulenz von *C. albicans* oder eines anderen pilzlichen Pathogens durch Antimykotika ist eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Bekämpfung einer Mykose.

## Stand der Technik

Das Interesse an Proteinen in *C. albicans*, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, führte zur zielgerichteten Suche nach Phosphatidylinositol 3-Kinasen in diesem Organismus.

Die in *C. albicans* gefundene Kinase CaVps34p (Eck, R.; Beer, K.; Wetzker, R.: EMBL-Datenbank-Eintragsnummer

Y09043) gehört zur Familie der Phosphoinositid 3-Kinasen (PI 3-Kinasen) eukaryotischer Zellen, deren Vertreter wichtige Funktionen bei der rezeptorstimulierten Signaltransduktion sowie bei der Regulation des intrazellulären Vesikeltransports besitzen. Sie werden aufgrund ihrer Aminosäuresequenz, Substratspezifität, Sensitivität gegenüber Inhibitoren sowie ihrer Zuordnung zu einem spezifischen Signaltransduktionsweg in drei Klassen eingeteilt (Vanhaesebroeck et al. (1997), TIBS 22: 267-272). CaVps34p gehört zur Klasse III, deren Vertreter das Lipid Phosphatidylinositol, ein integraler Bestandteil von Membranen, am Inositolring in 3'-Stellung phosphorylieren. Als erster Vertreter dieser Klasse war ScVps34p aus *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert worden (Bankaitis et al. (1986), PNAS 83: 9075-9079; Robinson et al. (1988), Mol. Cell. Biol. 8, 11: 4936-4948). PI 3-Kinasen der Klassen I und II können daneben auch Phosphatidylinositol(4)phosphat sowie PI(4,5)bisphosphat an Position 3 phosphorylieren.

Mit Hilfe genetischer Selektionsverfahren in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* wurden mehr als 40 Gene identifiziert, die beim intrazellulären Transport vakuolärer Proteine eine Rolle spielen (Bankaitis et al. (1986), PNAS 83: 9075-9079; Robinson et al. (1988), Mol. Cell. Biol. 8, 11: 4936-4948). Das Genprodukt von ScVPS34 (vacuolar protein sorting) wurde als Teil eines Signaltransduktionskomplexes identifiziert, welcher beim Sorting löslicher vakuolärer Hydrolasen (z. B. Carboxypeptidase Y, Proteinase A und B) vom Golgi-Komplex zur Vakuole eine Schlüsselrolle spielt (Herman und Emr (1990), Mol. Cell. Biol. 10, 12: 6742-6754). Dabei handelt es sich um einen rezeptorvermittelten vesikulären Transportprozeß.

Die Untersuchungen in *S. cerevisiae* haben ergeben, daß das Sorting vakuolärer Hydrolasen (z. B. Carboxypeptidase Y) tatsächlich auf der PI 3-Kinase-Aktivität von ScVps34p beruht (Stack (1995), J. Biol. Chem. 269, 50: 31 552-31 562). Das gebildete PI(3)phosphat ist auf noch ungeklärte Weise in die Knospung und Abschnürung der proteinbeladenen Vesikel an der cytoplasmatischen Seite des Golgi-Komplexes involviert.

Es gibt außerdem Befunde, nach denen ScVps34p auch bei verschiedenen Schritten der Endozytose eine Rolle spielt (Gammie et al. (1995), J. Cell Biol. 130: 553-596).

ScVps34p ist in *S. cerevisiae* mit der Proteinkinase ScVps15p assoziiert. Diese Serin-Threonin-Kinase rekrutiert ScVps34p zur Golgi-Membran und stimuliert über die membranassoziierte Komplexbildung mit ScVps34p dessen PI 3-Kinase-Aktivität (Stack et al. (1995), J. Biol. Chem. 269, 50: 31 552-31 562; Schu et al. (1993), Science 260, 88-91).

Nicht alle Proteintransportprozesse in Richtung Vakuole laufen über den dargestellten Transportweg. So wird die Alkalische Phosphatase, ein Protein der Vakuolenmembran, über einen alternativen Weg dorthin transportiert (Stack et al., log. cit.).

Mutanten aus *S. cerevisiae*, bei denen ScVPS34 deletiert wurde, sind bei Temperaturen über 30°C nicht lebensfähig, sekretieren lösliche vakuoläre Proteine und besitzen Defekte bei der Vakuolenazidifizierung und -verteilung auf die Tochterzellen (Pryer et al. (1992), Ann. Rev. Biochem. 61: 471-516); Raymond et al. (1992), Mol. Biol. Cell 3: 1389-1402). Außerdem weisen die Mutanten einen Defekt beim Transport endozytischer Vesikel hin zur Vakuole auf (Munn et al. (1994), J. Cell. Biol. 127: 373-386).

Auch in Humanzellen wurde eine Phosphatidylinositol-spezifische PI 3-Kinase gefunden (Volinia et al. (1995), EMBO J. 14: 3339-3348); Panaretou et al. (1997), J. Biol. Chem. 272: 2477-2485). Diese zeigt auf Aminosäureebene 37% Identität zu ScVps34p aus *S. cerevisiae*. Trotz dieser



Sequenzhomologie gibt es jedoch biochemische Unterschiede in der Sensitivität gegenüber dem bekannten PI 3-Kinase-Inhibitor Wortmannin und gegenüber geringen Konzentrationen eines nichtionischen Detergenz. Außerdem findet nur bei ScVps34p aus *S. cerevisiae* eine Autophosphorylierung statt (Volinia et al. log. cit.).

#### Beschreibung der Erfindung

CaVPS34 aus *C. albicans* wurde zunächst molekulargenetisch charakterisiert. Mittels Southernanalyse konnte gezeigt werden, daß das Gen nur in einer einzigen Kopie im Genom von *C. albicans* vorliegt (single-copy Gen). Außerdem wurde die Expression des Gens unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht. Die Expression von CaVPS34 konnte unter allen getesteten Wachstumsbedingungen nachgewiesen werden. Während der exponentiellen Wachstumsphase der Sproßzellen und während der Bildung von Hyphen verstärkt sich die Transkription des Gens auf das 8- bis 10fache. Die Regulation der Expression von CaVPS34 korreliert mit dem intensiven Metabolismus der Zellen unter diesen Bedingungen. Voraussetzung für die weitere funktionelle Charakterisierung von CaVPS34 in *C. albicans* war die Herstellung einer CaVPS34-Nullmutante. Da *C. albicans* diploid ist und keine sexuelle Phase aufweist, mußte die Disruption beider Allele des Gens sequentiell erfolgen. Das wurde durch ein wiederholtes Replacement von CaVPS34 durch eine Reporter-Gen-Kassette erreicht. Die Lebensfähigkeit der homozygoten Mutante zeigt, daß es sich bei CaVPS34 in *C. albicans* nicht um ein essentielles Gen handelt.

Es folgte die phänotypische Charakterisierung der Mutanten. Zunächst wurden dabei morphologische Charakteristika verglichen. Dabei zeigte die heterozygote Mutante keinen Unterschied zum Wildtyp. Die Zellen der Nullmutante sind jedoch vergrößert und weisen zu einem hohen Prozentsatz stark vergrößerte Vakuolen auf, wobei fast das gesamte Lumen der Zellen durch die Vakuolen ausgefüllt ist. Auch das Wachstum beider Mutanten wurde vergleichend zum Wildstamm untersucht. Dabei zeigte die Nullmutante ein verlangsames Wachstum.

Die Fähigkeit von *C. albicans*, Hyphen zu bilden, wird als ein wichtiger Virulenzfaktor diskutiert. In diesem Zusammenhang wurde überprüft, ob die CaVPS34-Mutanten noch in der Lage sind, den morphologischen Switch vom Sproßzellwachstum zum hyphalen Wachstum (Dimorphismus) auszuführen. Unter verschiedenen Hypheninduktionsbedingungen wurde gezeigt, daß das Fehlen von CaVPS34 die Bildung von Hyphen deutlich verzögert.

Untersuchungen zum Verhalten der Mutanten bei osmotischem Streß ausgelöst durch NaCl oder KCl ergaben eine erhöhte Sensitivität der CaVPS34-Nullmutante. Diese mangelnde Anpassung an den osmotischen Streß ist wahrscheinlich auf die eingeschränkte Funktionsfähigkeit der Vakuole in der Nullmutante zurückzuführen.

Eine wichtige Voraussetzung für die Pathogenese einer systemischen Candida-Infektion ist die Adhärenz von Candida-Zellen an Humanzellen (Epithelien und Endothelien). Die Adhärenz ist eine der Bedingungen für die Penetration von Candida ins Gewebe und damit für die Ausbreitung der Infektion. Es existieren eine Reihe etablierter Tests, mit deren Hilfe die Adhärenz quantitativ ermittelt werden kann. Der verwendete Ansatz geht auf den Nachweis der adhärenz-fähigen Zellen durch Calcofluor-Färbung und Fluoreszenzmesung zurück (Borg-von Zepelin et al. (1995), *Mycoses* 38: 339–347). Die Adhärenzversuche wurden mit Maus-Fibroblasten und HeLa-Karzinomzellen durchgeführt. Die Adhärenz der CaVPS34-Nullmutante an diese Zellen war

unter den getesteten Bedingungen fast vollständig gehemmt.

Dieses überraschende Ergebnis wies erstmals auf ein möglicherweise verändertes Virulenzverhalten von *C. albicans*-Zellen, denen die von CaVPS34 kodierte PI 3-Kinase fehlt, hin. Bisher war nicht bekannt, daß zwischen dem intrazellulären Transport von Proteinen und der Adhärenz an andere Zellen ein solcher Zusammenhang besteht.

Aus diesem Grunde wurde zunächst im alternativen Tiermodell untersucht, inwieweit das Fehlen von CaVPS34 einen Einfluß auf die Virulenz von *C. albicans* hat. Im Hühnerei-Candidosis-Modell (Härtl et al. (1995), *Drug Research* 45 (II), 8: 926–928) konnte eine signifikante Abnahme der Virulenz der CaVPS34-Nullmutante gegenüber dem Wildstamm nachgewiesen werden. Der Nachweis einer möglichen Beteiligung von CaVPS34 an der Ausprägung einer Candidosis war die Voraussetzung für die Durchführung entsprechender Untersuchungen im Maus-Candidosis-Infektionsmodell.

Das Maus-Candidosis-Modell ist der derzeit weltweit anerkannte Virulenztest für pathogene Keime. Über einen Zeitraum von drei Wochen wurde die Überlebensrate von Mäusen verglichen, denen a) *C. albicans* Wildtypstamm-Zellen oder b) *C. albicans* CaVPS34-Einfachmutanten-Zellen oder c) *C. albicans* CaVPS34-Nullmutanten-Zellen in drei verschiedenen Keimkonzentrationen intravenös appliziert worden waren. Dabei stellte sich heraus, daß die Ausprägung einer systemischen Candidosis mit Befall der Nieren und anschließendem Nierenversagen durch die Einfachmutante im Vergleich zum Wildtypstamm langsamer verläuft. Von ausschlaggebender Bedeutung für die Identifizierung von CaVps34p als Target für antifungale Substanzen war jedoch die beobachtete Avirulenz der Nullmutante (Abb. 1). Die Überlebensrate der mit der CaVPS34-Nullmutante inokulierten Mäuse betrug nach 20 Tagen in allen Keimzahlen 100%. Nach Abschluß des Versuches wurden die Nieren dieser Tiere untersucht, wobei kein Vorkommen von Candida-Zellen festgestellt werden konnte.

In einem weiteren Versuch wurden je drei Mäuse pro Candida-Stamm drei Tage nach der Keimapplikation getötet und auf den Befall ihrer Nieren mit *C. albicans* untersucht. Dabei wurde im Gegensatz zu Wildtypstamm und Einfachmutante keine Besiedlung der Nieren der mit der CaVPS34-Nullmutante infizierten Mäuse festgestellt.

Diese Ergebnisse belegen die völlig überraschende Tatsache, daß CaVps34p eine zelluläre Funktion besitzt, die für die Virulenz von *C. albicans* von essentieller Bedeutung ist.

Daraus ergibt sich die Möglichkeit, CaVps34p als Target für antifungale Substanzen in geeigneten Testsystemen einzusetzen. Die Lipidkinasefunktion der von CaVPS34 kodierten PI 3-Kinase eignet sich beispielsweise hervorragend für ein Screening mit hohem Durchsatz.

Für die Etablierung eines PI 3-Kinase-Assays mit *C. albicans* wurde untersucht, welche PI 3-Kinase-Aktivitäten in Wildstamm und Nullmutante vorliegen. *C. albicans* Proteinrohextrakte wurden in cytosolische und membranöse Fraktionen aufgetrennt und im in vitro Assay der PI 3-Kinaseaktivität eingesetzt. Im Wildstamm war die PI 3-Kinaseaktivität der Membranfraktion höher als die des Cytosols. Die Nullmutante zeigte eine geringe PI 3-Kinase-Restaktivität. Durch Zugabe von Phosphatidylinositol(4)phosphat und Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat zum PI 3-Kinase-Assay wurde das Substratspektrum der in *C. albicans* vorkommenden PI 3-Kinase(n) untersucht. Unter den gewählten Bedingungen wurde ausschließlich Phosphatidylinositol phosphoryliert.

In einem weiteren Versuch wurde die Hemmbarkeit mit dem bekannten PI 3-Kinaseinhibitor Wortmannin untersucht. Die PI 3-Kinaseaktivität der Proteinextrakte des

Wildstamms wurde durch micromolare Konzentrationen von Wortmannin deutlich gehemmt.

Die PI 3-Kinase CaVps34p aus *C. albicans* wurde somit unerwarteterweise als neuartiges molekulares Target für die antifungale Therapie identifiziert und bildet damit die Voraussetzung für das Auffinden neuer Substanzen mit antimykotischer Wirkung.

Diese Erkenntnis wird erfindungsgemäß für die Etablierung von zellfreien und zellulären Testsystemen zur Suche nach Inhibitoren pilzlicher PI 3-Kinasen genutzt, wobei der Schwerpunkt auf *C. albicans* liegt. Die folgende Erfindungsbeschreibung bezieht sich auf *C. albicans* als bevorzugte Ausführungsform, kann aber in analoger Weise auch auf andere Pilze übertragen werden.

Die Erfindung betrifft die Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen zum Screening nach antifungal wirksamen Substanzen.

Die erfindungsgemäße Verwendung erfolgt in zellfreien oder zellulären Testsystemen.

Ein zellfreies Testsystem ist z. B.

- a) ein System zur Bestimmung der PI 3-Kinaseaktivität unter dem Einfluß zu testender Substanzen, oder
- b) ein Verfahren zur Untersuchung der Interaktionen pilzlicher PI 3-Kinasen mit anderen Proteinen unter dem Einfluß zu testender Substanzen.

Ein zelluläres Testsystem ist z. B.

- a) ein zelluläres System zur Untersuchung der Wirkung von Substanzen auf einen eine PI 3-Kinase überexprimierenden Pilzstamm im Vergleich zu einem Referenzstamm, oder
- b) ein System zur Untersuchung der Interaktionen pilzlicher PI 3-Kinasen mit anderen Proteinen unter dem Einfluß zu testender Substanzen, oder
- c) ein System zur Untersuchung des Einflusses zu testender Substanzen auf die Transkription von Genen pilzlicher PI 3-Kinasen.

Eine pilzliche PI 3-Kinase im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist z. B. CaVps34p aus *C. albicans* oder eine zu CaVps34p aus *C. albicans* funktionshomologe Phosphatidylinositol 3-Kinase aus einem anderen pilzlichen Organismus. Dieser kann z. B. aus der Gruppe der humanpathogenen Pilze, zu der neben *Candida albicans* auch *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *Rhizopus oryzae*, *Absidia corymbifera*, *A. ramosa*, *Mucor pusillus*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* und andere gehören, ausgewählt werden, oder aber ein nicht humanpathogener Pilz wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* oder *Kluyveromyces lactis* sein. Bevorzugt ist die PI 3-Kinase CaVps34p aus *C. albicans*.

Eine Ausführungsform der Erfindung ist die Testung von reinen Substanzen oder Substanzgemischen auf ihre inhibitorische Wirkung auf die PI 3-Kinaseaktivität aus *C. albicans* oder anderen relevanten Pilzen. Die PI 3-Kinaseaktivität wird im Mikrotiterplattenformat oder einem ähnlichen Verfahren, welches einen hohen Durchsatz zu testender Substanzen erlaubt, gemessen. Ein solcher PI 3-Kinaseaktivitätstest kann im wesentlichen wie in der Literatur beschrieben durchgeführt werden (Stack et al. log. cit.).

Der Testansatz besteht a) aus dem auf eine der weiter unten genannten Möglichkeiten gewonnenen Enzym, b) dem Substrat (Lipidgemisch, mindestens enthaltend Phosphati-

dylinositol), c) ATP und [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP als Phosphorylierungsreagenz, d) dem Reaktionspuffer sowie e) verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Substanz. Die Reaktion wird mit der zu testenden Substanz vorinkubiert, durch ATP-Zugabe gestartet und nach 5 min mit HCl abgestoppt. Daran schließt sich die Extraktion der Lipide an. Der Anteil des eingetauchten  $^{32}$ P wird nach Zugabe eines flüssigen Scintillators in einem Cerenkov-Counter vermessen. Als Vergleich wird ein PI 3-Kinase-Standard-Assay ohne Zugabe von Substanzen durchgeführt. Liegt der gemessene Wert für eine Probe mit Substanzzugabe unter dem Wert des PI 3-Kinase-Standards, so besitzt diese Substanz inhibitorische Wirkung auf die PI 3-Kinase-Aktivität.

In solchen Testsystemen werden als mögliche Ausführungsformen der Erfindung Zellextrakte von *C. albicans*, rekombinant hergestelltes CaVps34p oder immunpräzipitiertes CaVps34p für einen PI 3-Kinaseassay eingesetzt.

Proteinrohextrakte aus *C. albicans* oder anderen relevanten Pilzen werden hergestellt, indem Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase in einem geeigneten Puffer aufgenommen, aufgeschlossen und die Homogenate mittels Zentrifugation von den Zelltrümmern abgetrennt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, durch eine anschließende Ultrazentrifugation cytoplasmatische und membranöse Fraktionen abzutrennen und anschließend im PI 3-Kinase-Assay einzusetzen.

Für die Gewinnung von rekombinantem CaVps34p eignen sich vor allem eukaryotische Expressionssysteme, da hier notwendige posttranslationale Modifikationen in vivo erfolgen können. Die Auswahl solcher Expressionssysteme ist groß, Beispiele sind *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, Insektenzellkulturen (Sf9), die das Baculovirus-System enthalten oder auch humane Zelllinien (z. B. COS7). Dazu wird die proteinkodierende Sequenz in an sich bekannter Weise in einen entsprechenden Expressionsvektor kloniert. Um das gewünschte Protein nach der Expression gut aufzureinigen zu können, wird es als Fusionsprotein z. B. mit Glutathion-S-Transferase oder einem Polyhistidin-Peptid (His-Tag) hergestellt und nach der Reinigung über Glutathion-Sepharose bzw. Nickel-NTA wieder abgespalten. Anschließend wird das gereinigte Protein im PI 3-Kinase-Assay eingesetzt.

Eine andere Möglichkeit der Gewinnung von CaVps34p besteht in der nativen Immunpräzipitation aus Zellextrakten von *C. albicans* mit Hilfe von Antikörpern.

CaVps34p kann als weitere Möglichkeit auch aus transformierten *C. albicans*- oder *S. cerevisiae*-Zellen immunpräzipitiert werden, die das *Candida*-Gen auf einem Multicopy-Plasmid enthalten. CaVps34p kann aus diesen Zellen ebenfalls durch partielle Reinigung mittels Ammoniumsulfatfällung gewonnen werden. Außerdem können auch Proteinrohextrakte bzw. Proteinfractionen solcher Zellen im Test eingesetzt werden.

Die Erfindung umfaßt weiterhin die Testung von Substanzen auf ihre mögliche inhibitorische Wirkung auf die Interaktion von CaVps34p mit anderen Proteinen beispielsweise mit Hilfe eines Affinitätssensors. Dabei wird CaVps34p auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Nach Zugabe eines möglichen Interaktionspartners (z. B. CaVps15p, CaSec14p) und der zu testenden Substanz kann die Stärke und Kinetik der Interaktion gemessen werden (Buckle et al. (1993), Biosens. Bioelectron. 8: 355-363; Cush et al. (1993), Biosens. Bioelectron. 8: 347-353; Rubio et al. (1997), Bio Techniques 22: 269-271; End et al. (1993), J. Biol. Chem. 268: 10 066-10 075).

Die erfindungsgemäße Verwendung von CaVps34p oder einer anderen pilzlichen PI 3-Kinase kann auch als Target in einem zellulären Testsystem, welches auf der Überexpres-



sion des genannten Proteins in einem entsprechenden eukaryotischen System (*C. albicans* für CaVps34p) beruht, erfolgen (Europäische Patentanmeldung Nr. 816.511).

Grundlage dieses Tests ist, daß Zellen, die ein bestimmtes Protein in vielfach höherer Konzentration als normal enthalten, gegenüber einem Inhibitor dieses Proteins eine geringere Sensitivität aufweisen. Die Wirksamkeit einer bestimmten Substanz als Inhibitor des Zielproteins ist am deutlich schlechteren Wachstum des Kontrollstammes im Vergleich zum Überexpressionsstamm erkennbar. Die Anwendbarkeit dieses Testsystems hängt vom Effekt ab, den der Aktivitätsverlust der PI 3-Kinase auf den pilzlichen Organismus hat. Für *C. albicans* konnte durch die Erzeugung von CaVPS34-Nullmutanten gezeigt werden, daß in diesem Fall das Wachstum 1,8fach verlangsamt ist.

Im konkreten Fall wird CaVPS34 in an sich bekannter Weise in einen Überexpressionsvektor kloniert und in *C. albicans* transformiert. Parallel dazu erfolgt die Transformation mit dem Ausgangsvektor. Nach Zugabe potentieller Inhibitoren und einer gewissen Inkubationszeit wird das Wachstum der Zellen mit überexprimierter Phosphatidylinositol 3-Kinase mit dem Wachstum der Kontrollzellen verglichen. Die Messung des Wachstums der Zellen in Mikrotiterplatten erfolgt durch turbidimetrische Verfahren. Die getestete Substanz besitzt inhibitorische Wirkung auf CaVps34p, wenn die Kontrollzellen deutlich schlechter als die Überexpressionszellen wachsen.

Die Testung der möglichen inhibitorischen Wirkung von Substanzen auf die Interaktion von CaVps34p mit anderen Proteinen kann in einer weiteren möglichen Ausführungsform der Erfindung durch den Einsatz von Zwei- und Multi-hybridssystemen in *S. cerevisiae* erfolgen (Chien et al. (1991), PNAS 88: 9578-9582); Munder und Fürst (1992), Mol. Cell. Biol. 12, 5: 2091-2099). Dabei wird eine pilzliche PI 3-Kinase z. B. als Fusionsprotein mit der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors GAL4 (Chien et al. log. cit.); und das interagierende Protein als Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne von GAL4 in *S. cerevisiae* als zelluläres System hergestellt. Nur bei einer stattfindenden Interaktion der beiden Proteine kommt es zur Transaktivierung und damit zur Expression des hinter der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors befindlichen Reportergens. Bei einer Hemmung der Wechselwirkung der untersuchten pilzlichen PI 3-Kinase und dem Effektorprotein durch Testsubstanzen unterbleibt die Expression des Reportergens.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Testung von Substanzen auf ihre direkte Wirkung auf die Expression von CaVPS34. Dabei werden die Northernanalyse oder zelluläre Reportersysteme (Heim und Fürst (1997), BIOforum 11: 597-602) angewendet.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft die Bereitstellung von Testkits zum Screening nach antifungalen Substanzen, gekennzeichnet dadurch, daß darin eine pilzliche PI 3-Kinase enthalten ist.

Die Testkits sind beispielsweise dadurch gekennzeichnet, daß

- a) die Komponenten eines zellfreien PI 3-Kinase-Assays, oder
- b) die Komponenten für ein zellfreies Testsystem zur Untersuchung der Interaktionen pilzlicher PI 3-Kinasen mit anderen Proteinen unter dem Einfluß zu testender Substanzen, oder
- c) die Komponenten eines zellulären Testsystems auf der Grundlage des Vergleichs des Wachstums eines PI 3-Kinase-Überexpressionsstammes im Vergleich zu einem Referenzstamm unter dem Einfluß zu testender

Substanzen, oder

d) die Komponenten eines zellulären Testsystems zur Untersuchung der Interaktionen pilzlicher PI 3-Kinasen mit anderen Proteinen unter dem Einfluß zu testender Substanzen (Zwei-hybridssystem), oder

e) die Komponenten eines zellulären Testsystems zur Untersuchung des Einflusses zu testender Substanzen auf die Transkription von Genen pilzlicher PI 3-Kinasen

darin enthalten sind.

Die Komponenten eines zellfreien Testkits für einen PI 3-Kinase-Assay umfassen i) eine pilzliche PI 3-Kinase, ii) das Substrat (Lipidgemisch, mindestens enthaltend Phosphatidylinositol), iii) ein Gemisch aus ATP und [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP, iiiii) den Reaktionspuffer.

Die Komponenten eines zellfreien Elisa-Testkits für einen Lipidbindungs-Assay umfassen i) eine pilzliche PI 3-Kinase, ii) deren Antikörper iii) an einen Träger gebundenes Phosphatidylinositol, iiiii) den Bindungspuffer, iiiiii) verschiedene Waschpuffer, iiiiii) enzymkonjugierte anti-IgG-Antikörper (Enzym könnte zum Beispiel die Peroxidase sein), iiiiii) Enzymreaktionspuffer.

Die Komponenten eines zellfreien Testkits für einen Proteinkinase-Assay umfassen i) eine pilzliche PI 3-Kinase, ii) das Proteinsubstrat, iii) ein Gemisch aus ATP und [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP, iiiii) den Reaktionspuffer.

Die Komponenten eines zellfreien ELISA-Testkits für einen Proteinkinase-Assay umfassen i) eine pilzliche PI 3-Kinase, ii) das Proteinsubstrat, iii) Antikörper gegen eine phosphorylierte Aminosäure, iiiii) Bindungspuffer, iiiiii) Waschpuffer, iiiiii) Reaktionspuffer.

Die Komponenten eines zellfreien Testkits für einen Autophosphorylierungs-Assay pilzlicher PI 3-Kinasen umfassen i) eine pilzliche PI 3-Kinase, ii) ein Gemisch aus ATP und [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP, iiiii) den Reaktionspuffer.

Die Komponenten eines zellfreien ELISA-Testkits für einen Autophosphorylierungs-Assay pilzlicher PI 3-Kinasen umfassen i) eine pilzliche PI 3-Kinase, ii) Antikörper gegen eine phosphorylierte Aminosäure, iii) Bindungspuffer, iiiiii) Waschpuffer, iiiiii) Reaktionspuffer.

Ein Testkit für die zellfreie Untersuchung von Interaktionen einer pilzlichen PI 3-Kinase mit anderen Proteinen enthält eine pilzliche PI 3-Kinase und mindestens ein interagierendes Protein (z. B. pilzliches Vps15p).

Komponenten eines Testkits für ein zelluläres Testsystem auf der Grundlage des Vergleichs des Wachstums eines PI 3-Kinase-Überexpressionsstammes im Vergleich zu einem Referenzstamm unter dem Einfluß zu testender Substanzen sind i) eine pilzliche PI 3-Kinase auf einem Überexpressionsvektor in einem entsprechenden pilzlichen Expressionsstamm (z. B. CaVPS34 in *C. albicans* überexprimiert), ii) der pilzliche Expressionsstamm mit dem Ausgangsvektor.

Die Komponenten eines Testkits für ein Zwei-hybridssystem umfassen z. B. eine pilzliche PI 3-Kinase als Fusionsprotein mit der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors GAL4 (Chien et al., log. cit.); und das interagierende Protein als Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne von GAL4.

Ein Testkit für die Analyse der Expression einer pilzlichen PI 3-Kinase mittels Reportergenassays ist beispielsweise dadurch gekennzeichnet, daß er den Promoterbereich einer pilzlichen PI 3-Kinase als Fusion mit einem Reportergen (z. B. Gen für das Grün fluoreszierende Protein (Chalfie et al. (1994), Science 263: 802-805)) enthält.

Im folgenden experimentellen Teil wird die Erfindung exemplarisch mit der PI 3-Kinase CaVps34p aus *C. albicans* beschrieben. Sie kann aber in analoger Weise auch mit ande-

ren pilzlichen PI 3-Kinasen durchgeführt werden.

### Experimenteller Teil

#### Isolierung und Klonierung von CaVPS34

Es wurden die Sequenzen bereits bekannter PI 3-, PI 4- und PI-Kinase-verwandter Proteine aus anderen Spezies (*S. cerevisiae*, Humanzellen) miteinander verglichen und festgestellt, daß in allen Proteinen Bereiche existieren, die eine große Ähnlichkeit zeigen. Dabei handelt es sich vor allem um die Lipidkinase-Domäne. Aus zwei Bereichen konservierter Aminosäuren wurden unter Berücksichtigung der spezifischen Codon-Nutzung in *C. albicans* PCR-Primer abgeleitet. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion konnte damit ein 444 bp-Produkt amplifiziert werden, welches kloniert und sequenziert wurde. Die Untersuchung der Homologie des PCR-Produktes zu bekannten PI-Kinasesequenzen ergab eine 65%ige Homologie zu Vps34p aus *S. cerevisiae* auf Aminosäureebene.

Um den gesamten offenen Leserahmen zu erhalten, wurde mit dem klonierten PCR-Produkt als Sonde eine *C. albicans* 1161 Fosmid Genbank (konstruiert von M. Strathmann, Stanford, U.S.A.) gescreent. Die positiven Klone wurden mittels Southern-Hybridisierung weiter analysiert und ein Fragment mit einer Größe von 7 kb in den Vektor pUC 19 subkloniert (hinterlegt als Plasmid pKE1 in *Escherichia coli* XL1Blue bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH DSMZ, Mascheroder Weg 1b, D-38 124 Braunschweig, am 1.9.1998 unter der Nummer DSM 12398 nach den Bestimmungen des Budapester Vertrages). Nach der kompletten Sequenzierung des Gens konnte ein offener Leserahmen von 3060 bp identifiziert werden (Eck, R.; Beer, K.; Wetzker, R.: EMBL-Datenbank-Eintragsnummer Y09043). Dieser kodiert für ein Protein von 1020 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 118 kDa. Die Homologie zu ScVps34p aus *S. cerevisiae* beträgt über das gesamte Gen auf Aminosäureebene 47%. Der C-terminale Teil des Gens, welcher die Lipidkinasedomäne enthält, weist 65% Homologie auf.

#### Untersuchung der Expression von CaVPS34

Die Expression des Gens wurde unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (Temperatur 28°C, 37°C; Hyphe-induktion mittels Serum oder N-Acetylglucosamin) analysiert, um die Regulation der Expression von CaVPS34 zu untersuchen. Dazu wurde nach verschiedenen Zeiten (0, 15, 30, 60, 120, 180 min) der Anteil von Hyphenzellen bestimmt und Gesamt-RNA isoliert. Gleiche Mengen RNA wurden einer Northernanalyse unterzogen. Die Hybridisierung erfolgte unter stringenten Bedingungen mit einer 3,0 kb-BsmI-Sonde von CaVPS34. Dabei konnte ein 3,5 kb-Transkript identifiziert werden, dessen Größe mit der Länge des Gens einschließlich untranslatierter Regionen übereinstimmt. Die Quantifizierung der Transkriptabundanz ergab eine schwache Expression (low abundance Gen) unter allen getesteten Wachstumsbedingungen und Zeiten im Vergleich zur Expression des Aktins (Kontrolle). Das Transkriptionsmuster zeigt weiterhin die Regulation der Expressionsstärke von CaVPS34 in Abhängigkeit vom Wachstum. Auf einem sehr niedrigen Expressionslevel wird CaVPS34 in *C. albicans* konstitutiv exprimiert. Unter Bedingungen sehr starken Wachstums (exponentielle Phase) erfolgt innerhalb von 120 min ein Anstieg der Expressionsstärke auf das 8 bis 9fache. Werden Hyphen induziert, erfolgt bereits innerhalb von 60 min eine Verzehnfachung der Transkriptabundanz.

### Herstellung der CaVPS34-Nullmutante

Voraussetzung für die weitere funktionelle Charakterisierung und Evaluierung als potentiell Target von CaVPS34 in *C. albicans* war die Herstellung einer CaVPS34-Nullmutante. Da *C. albicans* diploid ist und keine sexuelle Phase aufweist, mußte die Disruption beider Allele des Gens sequentiell erfolgen. Für die hierzu angewendete Methode des URA-Blastings (Fonzi und Irwine (1993), Genetics 134: 717-728) wurden am 3'- und 5'-Ende des Gens etwa 250 bp große Fragmente amplifiziert, deren überhängende Enden Restriktionsorte enthalten, mit Hilfe derer diese vor bzw. hinter die hisG-URA-hisG-Kassette des Disruptionsvektors pMB7 kloniert werden konnten. Die klonierten Abschnitte enthielten 25 bzw. 150 bp codierende Sequenz. Das resultierende Plasmid wurde in den URA-negativen *C. albicans*-Stamm CAI4 transformiert. Anschließend wurden auf Minimalagarplatten (ohne Uridin) bei 28°C uridinprototrophe Transformanten selektiert. Das Replacement eines CaVPS34-Allels durch den URA-Blaster erfolgte über die homologe Rekombination der chromosomalen Enden. Um diese Verfahrensweise auch auf das zweite Allel anwenden zu können, mußte zunächst die Uridinauxotrophie der heterozygoten CaVPS34-Mutante wiederhergestellt werden. Das wurde durch Selektion mit Hilfe von 5-Fluorootsäure erreicht. Unter diesen Bedingungen wachsen nur solche Transformanten, die das URA3-Gen durch intrachromosomale Rekombination wieder verloren haben. Mit einer so gewonnenen Ura<sup>-</sup>-Mutante erfolgte eine erneute Transformation, deren Ergebnis die Selektion uridinprototropher Mutanten war. Alle erhaltenen Mutanten wurden mittels Southernanalyse überprüft. Dabei konnte bestätigt werden, daß ein bzw. beide Allele von CaVPS34 disruptiert worden sind. Die Lebensfähigkeit der homozygoten Mutante zeigt, daß es sich bei CaVPS34 in *C. albicans* nicht um ein essentielles Gen handelt.

#### Morphologische Charakterisierung der Mutanten

Es erfolgte die phänotypische Charakterisierung der Mutanten. Zunächst wurden dabei morphologische Charakteristika verglichen. Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurde der differentielle Interferenzkontrast (Nomarski) eingesetzt. Dabei zeigte die heterozygote Mutante keinen Unterschied zum Wildtyp. Die Zellen der Nullmutante weisen jedoch zu einem hohen Prozentsatz stark vergrößerte Vakuolen auf, wobei fast das gesamte Lumen der Zellen durch die Vakuolen ausgefüllt ist. Auch die Zellen sind gegenüber denen des Wildstammes vergrößert. Mit Hilfe eines fluoreszierenden Vakuolenfarbstoffs (CellTracker Blue, Molecular Probes), welcher sich selektiv in den Vakuolen akkumuliert, konnte dieser Effekt fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden.

#### Untersuchung des Wachstums der Mutanten

Das Wachstum beider Mutanten wurde in Komplexmedium (YEPD) bei 28°C vergleichend zum Wildtypstamm untersucht. Dazu wurden Wachstumskurven über einen Zeitraum von 90 h aufgenommen. Die spezifischen Wachstumsraten und Verdopplungszeiten für das exponentielle Wachstum von Wildtyp und heterozygoter Mutante sind gleich, während die Nullmutante ein verlangsamtes Wachstum aufweist. Das Verhältnis der Verdopplungszeiten beträgt 1 (Wildtyp): 1 (Heterozygote): 1,8 (Nullmutante).



### Vergleich der Hyphenbildung des Wildtyps und der Mutanten

Die Fähigkeit von *C. albicans*, Hyphen zu bilden, wird als ein wichtiger Virulenzfaktor diskutiert. In diesem Zusammenhang wurde überprüft, ob die CaVPS34-Mutanten noch in der Lage sind, den morphologischen Switch vom Sproßzellwachstum zum hyphalen Wachstum (Dimorphismus) auszuführen. Dazu wurde unter den Bedingungen einer Flüssigkultur in Vollmedium (YEPD) bei 37°C und unter Zugabe von 15% fötalem Kälberserum die Hyphenbildung im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Wiederum waren zwischen dem Wildtyp und der heterozygoten Mutante keine Unterschiede feststellbar. Die Nullmutante zeigte jedoch eine Verzögerung bei der Bildung von Hyphen. Nach 30 min Inkubation waren 50% der Zellen des Wildtypstammes zum Hyphenwachstum übergegangen, die Nullmutante erreichte diesen Anteil an Hyphenzellen dagegen erst nach, 110 min. Auch in den Hyphen der Nullmutante ließen sich vergrößerte Vakuolen erkennen.

### Untersuchung der Mutanten auf osmotische Sensitivität

Die Testung der Mutanten auf Resistenz bzw. Sensitivität gegenüber osmotischem Streß erbrachte folgendes Ergebnis: Während der Wildstamm und die Heterozygote bei 1 M und 1,5 M NaCl auf Komplexagar normal wuchsen, war das Wachstum der Nullmutante deutlich gehemmt. Derselbe Effekt war bei 1 M und 1,5 M KCl zu beobachten. Diese mangelnde Anpassung an den osmotischen Streß ist wahrscheinlich auf die eingeschränkte Funktionsfähigkeit der Vakuole in der Nullmutante zurückzuführen.

### Untersuchung des Adhärenzverhaltens der Mutanten

Der Assay wurde in Mikrotiterplattenformat durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet (L929 Fibroblasten aus Mäusen und HeLa-Karzinomzellen). Nach dem Beschicken der Mikrotiterplatten mit den entsprechenden Zellen, wurden diese 96 h inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Candida-Zellen ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Sabouraud-Medium +15% fötales Kälberserum) und eine zweistündige Inkubation der Kulturen bei 37°C. Anschließend erfolgte die Färbung der Candida-Zellen durch die Zugabe von 20 µg/ml Calcofluor-white und eine nochmalige 30 minütige Inkubation bei 37°C. Nach mehrfachem Waschen der Testansätze verblieben nur adhärenzte Zellen auf der Mikrotiterplatte, deren Fluoreszenz im Fluoreszenzmeßgerät vermessen werden konnte. Ausgedrückt in relativen Fluoreszenzeinheiten erhält man beim Vergleich des Wildtypstammes mit der Nullmutante ein Verhältnis von 100 : 2,5. Die Adhärenz der Mutantenzellen ist also fast vollständig gehemmt.

### Virulenztests

Es wurden sechs Wochen alte männliche NMRI-Mäuse (Härlan-Winkelmann, Borcheln) eingesetzt, die zu je fünf Tieren in einem Käfig gehalten und jeden Tag kontrolliert wurden. Für die Virulenztests wurde *C. albicans* in Sabouraud-Medium bis zur späten logarithmischen Phase kultiviert, dann dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^8$ /ml eingestellt.

Die Applikation der Keime in die Mäuse erfolgte in 200 µl physiologischer NaCl-Lösung in die Schwanzvene der Tiere. Dabei wurden jeweils fünf Mäuse pro Versuch mit derselben Anzahl an Keimen inokuliert. Die pro Tier ge-

wählten Keimzahlen betragen  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$  und  $5 \times 10^4$ . Als Kontrolle wurde fünf Mäusen 200 µl Puffer gespritzt.

Per Vergleich erfolgte zwischen dem Wildtypstamm (SC 5314), der uridinprototrophen Einfachmutante (CA14Δvps34/VPS34) und der uridinprototrophen Nullmutante (CA14Δvps34/Δvps34). Über den gesamten Verlauf der Versuche von jeweils drei Wochen wurden die Mäuse regelmäßig gewogen und äußerlich auf ihren Gesundheitszustand untersucht. Es wurden insgesamt drei zeitlich unabhängige Versuche durchgeführt. Die täglichen Überlebensraten von der mit dem Wildtypstamm bzw. der Nullmutante infizierten Mäuse sind in Abb. 1 dargestellt.

Nach Applikation des Wildtyp-Stammes SC 5314 in der höchsten Keimzahl erfolgte ein sehr rasches Absterben der Tiere, so daß nach vier Tagen alle Mäuse verstorben waren. Das ist auf eine durch *C. albicans* ausgelöste Sepsis zurückzuführen. Die mittlere Keimzahl ließ die Überlebensrate nach sechs Tagen auf 20% absinken, ein Effekt, der ebenfalls der Sepsis zuzuordnen ist. Die niedrigste Keimzahl zeigt einen langsameren Krankheitsverlauf. Hier war die Überlebensrate nach 12 Tagen auf 35% abgesunken. Als Ursache dieses Verlaufes ist eine Nierencandidosis anzuschreiben. Dabei kommt es zu einer systemischen Infektion durch *C. albicans* mit anschließendem Organversagen der Nieren. Bei Abschluß des Versuches nach 20 Tagen betrug die Überlebensrate 15%. Die überlebenden Mäuse wurden abgetötet und auf die Belastung ihrer Nieren mit *C. albicans* untersucht. Dazu wurden die Nieren herauspräpariert, gewogen, in 3 ml Puffer aufgenommen, anschließend zermörsert und in verschiedenen Verdünnungen auf Komplexagar ausplattiert. So konnte die Keimzahl von Candida in den Nieren festgestellt werden. Es zeigte sich, daß auch die Nieren der überlebenden Tiere sehr stark mit Candida belastet waren.

Der Verlauf des Infektionsversuches mit der Einfachmutante ist in den beiden höheren Keimzahlen im wesentlichen mit dem des Wildtyps vergleichbar. Auch hier kommt es auf Grund einer Sepsis zum raschen Absterben der Tiere. Der Krankheitsverlauf bei der niedrigsten Konzentration ist jedoch im Vergleich zum Wildtyp verzögert. Nach 12 Tagen überlebten noch 55% der Mäuse. Bis zum Ende des Versuches verringerte sich die Überlebensrate noch einmal auf 25% und lag damit doppelt so hoch wie beim Wildtyp-Versuch. Diese Ergebnisse zeigen, daß das Krankheitsbild der Nierencandidosis in der heterozygoten Mutante langsamer ausgeprägt wird. Das spricht dafür, daß die Virulenz dieser Mutanten in bezug auf eine systemische Infektion eingeschränkt ist.

Nach Applikation der Nullmutante konnte in allen drei Konzentrationen keinerlei Krankheitsbild bei den Mäusen festgestellt werden. Die Überlebensraten nach 20 Tagen betrugen 100%. Damit wurde deutlich gezeigt, daß CaVPS34-Nullmutanten im Maus-Candidosis-Modell avirulent sind. Je drei Mäuse pro Keimzahl und Versuch wurden auf eine mögliche Candida-Belastung der Nieren getestet (wie bereits für den Wildstamm beschrieben), wobei wiederum kein Befall festgestellt werden konnte.

Parallel zu den Virulenzversuchen wurden je drei Mäuse pro Wildstamm, Einfachmutante und Nullmutante mit der Keimzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen inokuliert und nach drei Tagen abgetötet, um die Nieren nach Entnahme zu untersuchen. Am höchsten war die Candida-Keimzahl in den Nieren der Tieren, welche den Wildstamm appliziert bekommen hatten. Die Keimzahl in den Nieren der mit der Einfachmutante belasteten Mäuse betrug nur ein Viertel davon. Die Besiedlung der Nieren durch Candida-Zellen, denen ein Allel von CaVPS34 fehlt, erfolgt also langsamer. In den Nieren der Mäuse, denen die CaVPS34-Nullmutante appliziert wurde, war *C. albicans* nach drei Tagen überhaupt nicht nachweis-



bar. Da auch die Mäuse des Infektionsversuches über 20 Tage nach Abschluß keinerlei *Candida*-Besiedlung der Nieren aufwiesen, konnte gezeigt werden, daß CaVPS34 für die Besiedlung der Nieren mit *C. albicans* und die Virulenz im Mausmodell essentiell ist.

#### PI 3-Kinase-Untersuchungen

Für die Etablierung eines PI 3-Kinase-Assays mit *C. albicans* wurde untersucht, welche PI 3-Kinaseaktivitäten in Wildstamm und Nullmutante vorliegen. Dazu wurden Proteinrohextrakte aus Zellen hergestellt, die bei 28°C in Komplexmedium bis zur mittleren logarithmischen Phase gewachsen waren. Die Rohextrakte wurden durch Ultrazentrifugation in cytosolische und membranöse Fraktionen getrennt. Jeweils 4 µg Protein der einzelnen Fraktionen wurden für den PI 3-Kinase-Assay eingesetzt. Die 50 µl-Ansätze bestanden aus 20 mM HEPES, pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mg/ml ultraschallbehandeltem Phosphatidylinositol; 60 µM ATP; 10 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP und 4 µg Gesamtprotein. Nach 5 min Inkubationszeit bei 25°C wurden die Reaktionen mit 1 M HCl abgestoppt und die Lipide mit Chloroform/Methanol (1 : 1) extrahiert. Es erfolgte die Auftrennung und Detektion der Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatografie. Als Kontrolle wurde ein PI 3-Kinasestandard mitgeführt. Im Wildstamm war die PI 3-Kinaseaktivität der Membranfraktion höher als die des Cytosols. Die Nullmutante zeigte eine geringe PI 3-Kinase-Restaktivität. Durch Zugabe von Phosphatidylinositol(4)phosphat und Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat zum beschriebenen PI 3-Kinase-Assay wurde das Substratspektrum der in *C. albicans* vorkommenden PI 3-Kinase(n) untersucht. Unter den gewählten Bedingungen wurde ausschließlich Phosphatidylinositol phosphoryliert.

In einem weiteren Versuch wurde die Hemmbarkeit mit dem PI 3-Kinaseinhibitor Wortmannin untersucht. Die PI 3-Kinaseaktivität der Proteinextrakte des Wildstamms wurde durch 10 µM Wortmannin deutlich gehemmt.

#### Ausführungsheispiel (Beispiel für ein Screeningverfahren)

##### 1. Gewinnung von CaVps34p für den Einsatz im PI 3-Kinase-Assay

##### 1.1. Gewinnung von Proteinrohextrakten bzw. von einzelnen Proteinfractionen

*C. albicans* SC 5314 wird bis zur mittleren logarithmischen Phase in YEPD-Medium kultiviert. Die Zellen werden abzentrifugiert und 2 mal in 1 × PBS-Puffer gewaschen. Anschließend werden sie in Extraktionspuffer aufgenommen (0,1 M KCl, 15 mM HEPES pH 7,5, 3 mM EGTA, 10% Glycerol, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin, Proteaseinhibitorcocktail) und nach Zugabe von Glasperlen im Bead-Beater aufgeschlossen. Das Lysat wird durch Zentrifugation bei 4800 rpm geklärt. Im PI 3-Kinase-Assay kann nun der Proteinrohextrakt oder aber eine der beiden durch zusätzliche Ultrazentrifugation bei 100 000 × g aufgetrennten Fraktionen (cytosolische Fraktion, Membranfraktion) eingesetzt werden. Es werden jeweils 4 µg Gesamtprotein pro Meßansatz im PI 3-Kinase-Assay eingesetzt.

##### 1.2. Herstellung von CaVps34p als rekombinantes Protein

Für die rekombinante Herstellung des Proteins wird der Expressionsvektor pESP1 (STRATAGENE) aus *S. pombe* verwendet. CaVPS34 wird mit Hilfe entsprechender Primer und dem Plasmid pKE1 (DSMZ-Eintragsnummer 12398)

als Template mittels PCR amplifiziert und über BamHI und SmaI im richtigen Leserahmen in diesen Vektor kloniert. Die klonierte proteinkodierende Sequenz befindet sich damit hinter dem Glutathion-S-Transferase(GST)-Teil und wird als Fusionsprotein mit GST exprimiert. Die Expression erfolgt in dem Leu -Stamm *S. pombe* SP-Q01. Mit dem im Vektor enthaltenen Leu-Gen aus *S. cerevisiae* als Selektionsmarker kann diese Auxotrophie komplementiert werden. Die Induktion erfolgt durch Wachstum in EMM-Medium ohne Thiamin, da pESP1 einen durch Thiamin reprimierbaren Promoter enthält. Der Aufschluß der Zellen wird in PBST-Puffer unter Zugabe von Proteasehemmern durch Vortexieren mit Glasperlen erreicht. Die Zelltrümmer werden abzentrifugiert und das Protein aus dem Überstand mit Hilfe von Glutathion-Sepharose aufgereinigt.

##### 1.3. Gewinnung von CaVps34p mittels nativer Immunpräzipitation aus Zellextrakten von *C. albicans*

Die native Immunpräzipitation der PI 3-Kinase aus *C. albicans* erfolgt nach der in der Literatur (Stack et al., log. cit.) für ScVps34p aus *S. cerevisiae* beschriebenen Methode. *C. albicans* SC 5314 wird bis zur mittleren logarithmischen Phase bei 28°C in YEPD-Medium kultiviert. Nach dem Abzentrifugieren und Waschen der Zellen, werden diese in kaltem TBS-Puffer (140 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7,4) in Gegenwart von Proteaseinhibitoren (1 mM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin, Proteaseinhibitorcocktail) aufgenommen und mit Hilfe von Glasperlen (Ø 0,5 mm) in einem Bead-Beater aufgeschlossen. Das Lysat wird bei 13 000 × g 2 min zentrifugiert (4°C) und über Protein A-Sepharose vorgereinigt. Anschließend erfolgt für 2–4 h bei 4°C die Inkubation mit CaVps34p-spezifischem Antiserum. Die präzipitierten Immunkomplexe werden über Protein A-Sepharose gereinigt und mehrmals mit TBS-Puffer gewaschen.

#### 2. PI 3-Kinase-Assay im Mikrotiterplattenformat

Um in kurzer Zeit sehr viele Substanzen auf ihre mögliche inhibitorische Wirkung auf die Phosphatidylinositol 3-Kinase testen zu können (high-throughput-screening), werden die Assays in Mikrotiterplatten durchgeführt. Ein solcher Ansatz (50 µl) besteht aus folgenden Komponenten: 20 mM HEPES, pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mg/ml ultraschallbehandeltes Phosphatidylinositol; 60 µM ATP; 10 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP; 0,2–0,5 OD<sub>600</sub>-Äquivalente immunpräzipitiertes CaVps34p oder 4 µg Gesamtprotein. Die Reaktionsansätze werden in verschiedenen Konzentrationen mit den zu testenden Substanzen versetzt und 5 min bei 25°C vorinkubiert. Durch Zugabe von ATP wird die Reaktion gestartet. Nach 5 min bei 25°C wird die Reaktion durch die Zugabe von 80 µl 1 M HCl abgestoppt, und mit 160 µl Chloroform/Methanol (1 : 1) werden die Lipide extrahiert. Die organische Phase, welche die Lipide enthält, wird schließlich eingengt und mit 250 µl eines Scintillators (z. B. CytoScint von ICN) versetzt. Mittels eines Scintillationscounters kann nun der Anteil des eingebauten <sup>32</sup>P vermessen werden. Als Standard zum Vergleich wird ein PI 3-Kinase-Assay ohne Zugabe einer zu testenden Substanz mitgeführt. Liegt der gemessene Wert für den Einbau von radioaktivem Phosphor bei einem Ansatz mit einer Testsubstanz unter dem Wert des PI 3-Kinase-Standards, so hat diese Substanz eine inhibitorische Wirkung auf die PI 3-Kinase. Als Standard für die inhibitorische Wirkung einer Substanz auf die PI 3-Kinaseaktivität wird Wortmannin als PI 3-Kinase-Inhibitor eingesetzt. Weitere Kontrollansätze sind Assays, die nur mit den Lösungsmitteln der Substanzen (z. B. DMSO) vorinkubiert werden. Damit soll ausgeschlossen werden, daß die PI 3-Kinase-Ak-

tivität bereits durch den Einfluß von Lösungsmitteln beeinträchtigt wird.

3. Bereitstellung eines Testkits für die Durchführung von PI 3-Kinase-Assays zum Screening nach Inhibitoren der PI 3-Kinase aus *C. albicans* 5

Der Kit enthält a) die PI 3-Kinase aus *C. albicans* auf einem Expressionsvektor (pESP1) in rekombinanten *S. pombe* SP-Q01-Zellen, aus denen die PI 3-Kinase nach Induktion der Expression unter Verwendung von Standardprozeduren isoliert werden kann; oder aber das bereits gereinigte rekombinante Protein und b) ein Lipidgemisch aus Phosphatidylinositol, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphoethanolamin und Sphingomyelin als Substrat, c) ein Gemisch aus ATP und [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP als Phosphorylierungsreagenz und d) den Reaktionspuffer, bestehend aus 20 mM HEPES, pH 7,5 und 10 mM MgCl<sub>2</sub>. 10 15

Experimentelle Protokolle, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet aber nicht beschrieben wurden, sind in der Literatur als Standardmethoden beschrieben (z. B. Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley, 1995). 20 25

#### Patentansprüche

1. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen zum Screening nach antifungal wirksamen Substanzen.
2. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß das Screening in einem zellfreien Testsystem erfolgt. 30
3. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß das Screening in einem zellulären Testsystem erfolgt. 35
4. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die PI 3-Kinase aus einem pilzlichen Organismus, ausgewählt aus der Gruppe der humanpathogenen Pilze wie *Candida albicans*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *Rhizopus oryzae*, *Absidia corymbifera*, *A. ramosa*, *Mucor pusillus*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Epidermophyton floccosum* und *Microsporum canis*, stammt. 40 45
5. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 4, gekennzeichnet dadurch, daß es sich bei der PI 3-Kinase um CaVps34p aus *Candida albicans* handelt. 50
6. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die verwendete PI 3-Kinase aus einem Organismus der Gruppe der nicht humanpathogenen Pilze ausgewählt wird.
7. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 2, gekennzeichnet dadurch, daß das Testsystem ein zellfreies System zur Bestimmung der PI 3-Kinaseaktivität unter dem Einfluß zu testender Substanzen ist. 55
8. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 2, gekennzeichnet dadurch, daß das Testsystem ein zellfreies System zur Bestimmung der Lipidbindungsaktivität der PI 3-Kinase unter dem Einfluß zu testender Substanzen ist. 60
9. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 2, gekennzeichnet dadurch, daß das Testsystem ein zellfreies System zur Bestimmung der Proteinkinaseaktivität der PI 3-Kinase unter dem Einfluß 65

zu testender Substanzen ist.

10. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 2, gekennzeichnet dadurch, daß das Testsystem ein zellfreies System zur Bestimmung der Autophosphorylierung der PI 3-Kinasen unter dem Einfluß zu testender Substanzen ist.

11. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 2, gekennzeichnet dadurch, daß das Testsystem ein zellfreies System zur Untersuchung der Interaktionen pilzlicher PI 3-Kinasen mit anderen Proteinen unter dem Einfluß zu testender Substanzen ist.

12. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 3, gekennzeichnet dadurch, daß das Testsystem ein zelluläres System zur Untersuchung der Wirkung von Substanzen auf einen eine PI 3-Kinase überexprimierenden Pilzstamm im Vergleich zu einem Referenzstamm ist.

13. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 3, gekennzeichnet dadurch, daß das Testsystem ein zelluläres System zur Untersuchung der Interaktionen pilzlicher PI 3-Kinasen mit anderen Proteinen unter dem Einfluß zu testender Substanzen ist.

14. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 3, gekennzeichnet dadurch, daß das Testsystem ein zelluläres System zur Untersuchung des Einflusses zu testender Substanzen auf die Transkription von Genen pilzlicher PI 3-Kinasen ist.

15. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß zellfreie Testsysteme zur Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von Substanzen auf die Phosphatidylinositol 3-Kinaseaktivität aus einem pilzlichen Organismus eingesetzt werden, wobei die Testsysteme aus folgenden Komponenten bestehen:

- a) PI 3-Kinase
- b) Substrat (Lipidgemisch, mindestens enthaltend Phosphatidylinositol)
- c) Reaktionspuffer
- d) zu testende Substanz.

16. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß zellfreie Testsysteme zur Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von Substanzen auf die Lipidbindungsaktivität pilzlicher PI 3-Kinasen in einem ELISA-Test eingesetzt werden, wobei das Testsystem aus folgenden Komponenten besteht:

- a) oberflächenfixiertes Phosphatidylinositol
- b) PI 3-Kinase
- c) Antikörper gegen PI 3-Kinase
- d) enzymkonjugierter Anti-IgG-Antikörper
- e) Blocking-Reagenzien
- f) Wasch-Substanzen
- d) zu testende Substanz.

17. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß zellfreie Testsysteme zur Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von Substanzen auf die Proteinkinaseaktivität pilzlicher PI 3-Kinasen eingesetzt werden, wobei das Testsystem aus folgenden Komponenten besteht:

- a) PI 3-Kinase
- b) Proteinsubstrat der PI 3-Kinase
- c) Reaktionspuffer
- d) zu testende Substanz.

18. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß zellfreie Testsysteme zur Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von Substanzen auf die Proteinkinaseaktivität pilzlicher PI 3-Kinasen in einem ELISA-Assay einge-

setzt werden, wobei das Testsystem aus folgenden Komponenten besteht:

- a) PI 3-Kinase
  - b) Proteinsubstrat der PI 3-Kinase
  - c) Antikörper gegen eine phosphorylierte Aminosäure 5
  - d) enzymkonjugierter Anti-IgG-Antikörper
  - e) Blocking-Reagenzien
  - f) Wasch-Substanzen
  - g) zu testende Substanz. 10
19. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß zellfreie Testsysteme zur Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von Substanzen auf die Autophosphorylierung von pilzlichen PI 3-Kinasen eingesetzt werden, wobei das Testsystem aus folgenden Komponenten besteht: 15
- a) PI 3-Kinase
  - b) Reaktionspuffer
  - c) zu testende Substanz. 20
20. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß zellfreie Testsysteme zur Untersuchung der inhibitorischen Wirkung von Substanzen auf die Autophosphorylierung von pilzlichen PI 3-Kinasen in einem ELISA-Test eingesetzt werden, wobei das Testsystem aus folgenden Komponenten besteht: 25
- a) PI 3-Kinase
  - b) Antikörper gegen eine phosphorylierte Aminosäure
  - c) enzymkonjugierter Anti-IgG-Antikörper 30
  - d) Blocking-Reagenzien
  - e) Wasch-Substanzen
  - f) zu testende Substanz.
21. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen in einem zellfreien Testsystem gemäß Anspruch 2, gekennzeichnet dadurch, daß die verwendete PI 3-Kinase als Komponente eines Proteinrohextraktes vorliegt. 35
22. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen in einem zellfreien Testsystem gemäß Anspruch 2, gekennzeichnet dadurch, daß die PI 3-Kinase aus Zellextrakten von *C. albicans* mittels Immunpräzipitation mit Hilfe eines Antikörpers gegen diese PI 3-Kinase gewonnen wird. 40
23. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen in einem zellfreien Testsystem gemäß Anspruch 2, gekennzeichnet dadurch, daß die PI 3-Kinase aus *C. albicans* aus Zellextrakten von *C. albicans*- oder *S. cerevisiae*-Stämmen immunpräzipitiert wird, welche diese zusätzlich von einem Multicopy-Plasmid exprimieren. 45
24. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen in einem zellfreien Testsystem gemäß Anspruch 2, gekennzeichnet dadurch, daß die PI 3-Kinase als rekombinantes Protein in einem geeigneten Expressionssystem hergestellt und in gereinigter Form im Assay eingesetzt wird. 50
25. Verwendung von pilzlichen PI 3-Kinasen in einem zellfreien Testsystem gemäß Anspruch 2, gekennzeichnet dadurch, daß die PI 3-Kinase durch partielle Reinigung mittels Ammoniumsulfatfällung aus pilzlichen Zellextrakten gewonnen wird. 55
26. Verwendung der PI 3-Kinase aus *C. albicans* als Target in einem zellulären Testsystem gemäß Anspruch 3, gekennzeichnet dadurch, daß der Einfluß der zu testenden Substanzen auf das Wachstum eines *C. albicans*-Stammes, der diese PI 3-Kinase auf einem Überexpressionsvektor enthält, im Vergleich zu einem *C. albicans*-Stamm, der nur den Ausgangsvektor enthält, untersucht wird. 60
27. Verwendung der PI 3-Kinase aus *C. albicans* als Target in einem zellulären Testsystem gemäß Anspruch

3, gekennzeichnet dadurch, daß der Einfluß der zu testenden Substanzen auf das Wachstum eines *C. albicans*-Stammes, der diese PI 3-Kinase auf einem oder mehreren Chromosomen unter der Kontrolle eines starken und/oder regulierbaren Promoters enthält, im Vergleich zu einem *C. albicans*-Stamm, der nur die Wildtypallele enthält, untersucht wird.

28. Verwendung der PI 3-Kinase gemäß Anspruch 26 und 27, wobei der Überexpressions- und Referenzstamm aus einem anderen pilzlichen Organismus erzeugt werden und die überexprimierte PI 3-Kinase aus diesem Organismus stammt.

29. Testkit zum Screening nach antifungalen Substanzen, gekennzeichnet dadurch, daß er eine pilzliche PI 3-Kinase enthält.

30. Testkit gemäß Anspruch 29, gekennzeichnet dadurch, daß er die Komponenten eines zellfreien PI 3-Kinase-Testsystems enthält, wobei die Komponenten sind:

- a) eine pilzliche PI 3-Kinase
- b) Substrat (Lipidgemisch, mindestens enthaltend Phosphatidylinositol)
- c) Gemisch aus ATP und [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP
- d) Reaktionspuffer.

31. Testkit gemäß Anspruch 29, gekennzeichnet dadurch, daß er die Komponenten eines zellulären Testsystems auf der Grundlage des Vergleichs des Wachstums eines PI 3-Kinase-Überexpressionsstammes im Vergleich zu einem Referenzstamm unter dem Einfluß zu testender Substanzen enthält, wobei die Komponenten a) eine pilzliche PI 3-Kinase auf einem Überexpressionsvektor in einem entsprechenden pilzlichen Expressionsstamm, b) den entsprechenden pilzlichen Expressionsstamm mit dem Ausgangsvektor sind.

32. Testkit gemäß Anspruch 29, gekennzeichnet dadurch, daß er die Komponenten für die in vitro Untersuchung von Interaktionen einer pilzlichen PI 3-Kinase mit anderen Proteinen enthält, wobei die Komponenten eine pilzliche PI 3-Kinase und ein interagierendes Protein umfassen.

33. Testkit gemäß Anspruch 29, gekennzeichnet dadurch, daß er die Komponenten für ein Zweihybridssystem enthält, umfassend eine pilzliche PI 3-Kinase als Fusionsprotein mit der DNA-Bindedomäne eines Transkriptionsfaktors und das interagierende Protein als Fusionsprotein mit der Aktivierungsdomäne dieses Transkriptionsfaktors.

34. Testkit gemäß Anspruch 29, gekennzeichnet dadurch, daß er die Komponenten für die Analyse der Expression einer pilzlichen PI 3-Kinase mittels Reporter-genassays, umfassend den Promoterbereich einer pilzlichen PI 3-Kinase fusioniert mit einem Reporter-gen enthält.

---

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

---



- Leerseite -

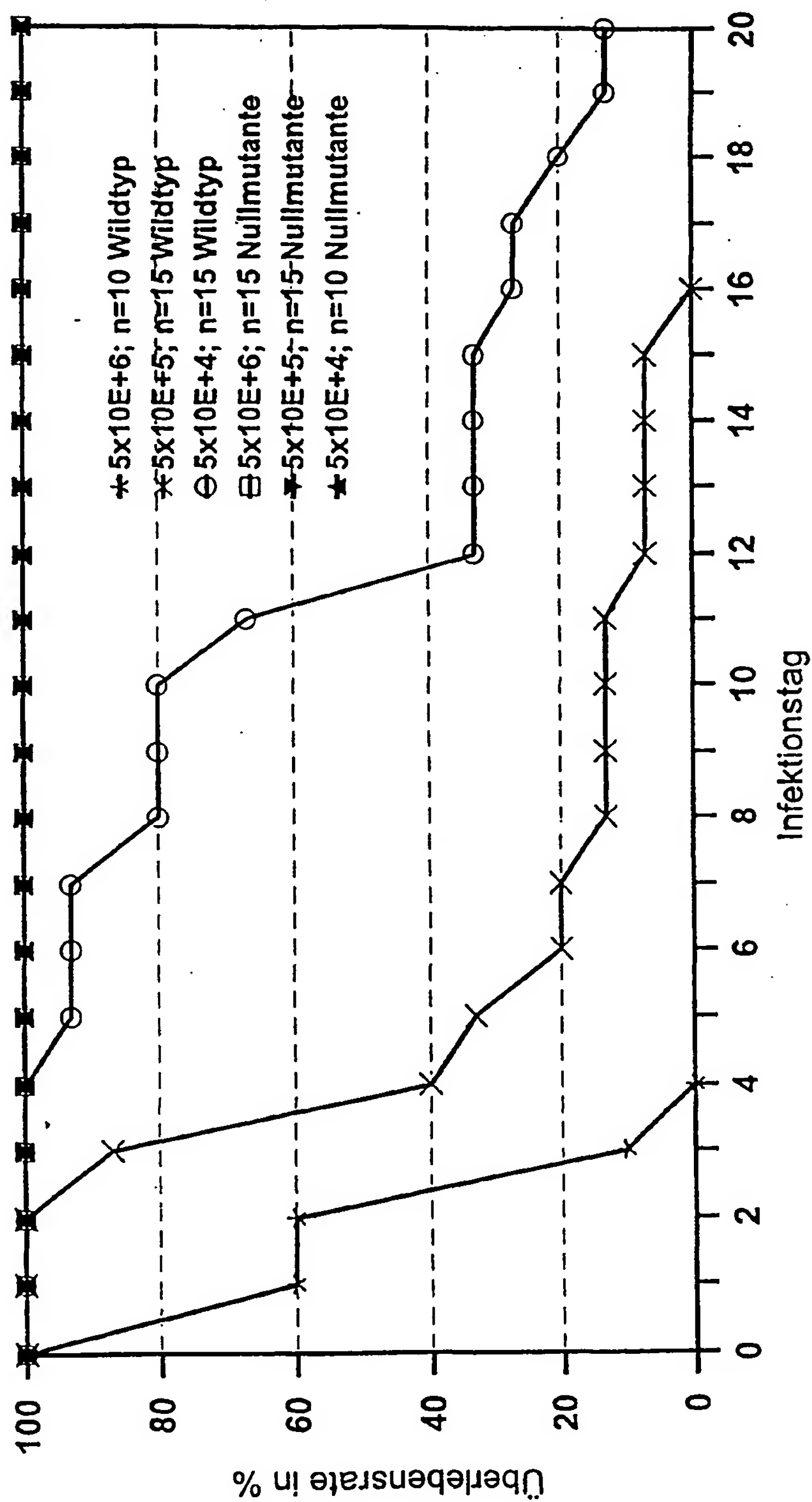


Abb.1: Virulenztest mit *C. albicans* SC 5314 (Wildtyp) und CA14 vps34/vps34 (Nullmutante) an männlichen NMRI-Mäusen